

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520081153472

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

不同浓度富血小板血浆复合异种小牛脱蛋白骨促进前交叉韧带重建后
腱 - 骨愈合的组织学观察

HISTOLOGICAL OBSERVATION OF TENDON-BONE
HEALING AFTER ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT
RECONSTRUCTION BY DIFFERENT
CONCENTRATIONS OF PLATELET RICH PLASMA
COMBINED WITH DEPROTEINIZED BONE IN CALF

赵耀

指导教师姓名: 翟文亮 副教授

专 业 名 称: 骨外科学

论文提交日期: 2011 年 05 月

论文答辩日期: 2011 年 05 月
2011 年 05 月

不同浓度富血小板血浆复合异种
小牛脱蛋白骨促进前交叉韧带
重建后腱骨愈合的组织学观察

赵耀

指导老师

翟文亮

副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(富血小板血浆复合物对腱-骨愈合影响的实验研究)课题(组)的研究成果,获得(南京军区医学科技创新课题基金资助项目(09MA070))课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学附属东南医学和厦门大学)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

目的 前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 重建中腱 - 骨愈合情况是手术成败的关键因素。将不同浓度富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) / 异种小牛脱蛋白骨 (deproteinized bone, DPB) 凝胶复合物作为骨隧道填充物, 观察 ACL 重建后腱 - 骨愈合的组织学变化, 探讨该复合物对腱 - 骨愈合的促进作用, 并确定 PRP 的最佳浓度。

方法 取新西兰大白兔耳中央动脉血 8 mL, 采用 Landesberg 方法制备 PRP, 并将上清液作为稀释剂, 制备浓度分别为 30%、60%、100% 的 PRP。取新鲜新生小牛股骨骺端松质骨, 经 30% H₂O₂、乙醚交替浸泡 24 h, 连续 6 次, 制备 DPB。将 DPB 浸泡于不同浓度 PRP 中并加入激活剂制备 PRP/DPB 凝胶复合物。取 54 只 8 ~ 12 月龄新西兰大白兔, 体重 (2.5±0.4) kg, 随机分成 3 组 (n=18), 分别为 30%PRP/DPB 凝胶复合物组 (A 组)、60%PRP/DPB 凝胶复合物组 (B 组)、100%PRP/DPB 凝胶复合物组 (C 组)。实验动物制备双侧 ACL 缺损模型。随机取一侧下肢以对应浓度的 PRP/DPB 凝胶复合物作为骨隧道填充物, 以自体半腱肌肌腱重建 ACL, 作为实验侧; 另一侧行自体半腱肌肌腱重建 ACL, 作为对照侧。术后观察各组动物一般情况, 于术后 3、6、12 周双膝关节行大体观察及 HE 染色, 光镜下观察腱 - 骨间愈合情况, 并参照 Demirag 等标准对腱 - 骨界面愈合情况进行 I、II、III、IV 级半定量评价。

结果 大体观察: 术后 3 周各组关节滑液稍增多, 股骨隧道内未见骨样组织; 6 周时各组无关节积液, 隧道内口见瘢痕组织增生; 12 周时各组移植肌腱与骨隧道壁纤维组织连接致密。组织学观察: A 组实验侧术后 3 周, 腱 - 骨界面间形成新生肉芽组织界面; 6 周时腱 - 骨界面间出现宽度不一的 Sharpey 样纤维; 12 周时腱 - 骨界面 Sharpey 样纤维排列有序, 形成不规则、模糊的“潮线”。B 组实验侧在各时间点腱 - 骨界面胶原纤维连接均优于其他各组; 术后 3 周腱 - 骨界面发现排列较规整的类软骨细胞; 6 周时腱 - 骨界面骨隧道类软骨细胞单位面积数量明显多于其他组; 12 周时腱 - 骨界面可见移植类软骨细胞增生, 分化成熟, Sharpey 样纤维连接致密有序。C 组实验侧 3 周时腱 - 骨界面胶原纤维连接与 A 组实验侧及对照侧相似, 6、12 周相对成

熟的致密结缔组织分化较差。参照 Demirag 等标准对腱 - 骨界面愈合进行分级, 术后 3、6 周 B 组实验侧和对照侧、术后 12 周 B 组实验侧与 C 组实验侧, 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 其余各组实验侧及同组实验侧与对照侧比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。 结论 PRP 浓度为 60% 时, 其与 DPB 的复合物形成凝胶后具有良好的生物相容性和骨诱导作用, 可提高兔 ACL 重建术后腱 - 骨愈合。

关键词: 富血小板血浆 前交叉韧带 腱-骨愈合

中图分类号: R686.5 R697.4 **文献标志码:** A

HISTOLOGICAL OBSERVATION OF TENDON-BONE HEALING AFTER ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT RECONSTRUCTION BY PLATELET RICH PLASMA COMBINED WITH DEPROTEINIZED BONE IN CALF/ZHAO Yao, ZHAI Wenliang. Department of Orthopaedics, Affiliated Dongnan Hospital, Xiamen University, Zhangzhou Fujian, 363000, P.R.China. Corresponding author: ZHAI Wenliang, E-mail: wlzhai@263.net

Abstract

Objective The tendon-bone healing is the key point to ensure the success of the reconstruction. To observe the histological change in the tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction by different concentrations of platelet rich plasma (PRP) combined with deproteinized bone (DPB) of calf as bone tunnel infilling and to investigate the active effect of the complex on tendon-bone healing and to define the optimal concentration of PRP.

Methods Eight mL blood was drawn from central artery of New Zealand rabbit ears; platelet-rich plasma (PRP) was prepared by Landesberg method, and liquid supernatant was used as thinner to prepare different concentrations of PRP (30%, 60% and 100%). Fresh osteoepiphysis spongy bone was harvested from lower end of femur of newborn calf to prepare DPB by way of 30% H₂O₂ and ether alternating soaking for 24 hours continuous 6 times. DPB was soaked in different concentrations of PRP and mixed with activator to prepare the PRP/DPB complex. A total of 54 New Zealand white rabbits, weighing (2.5 ± 0.4) kg, were divided randomly into 3 groups: group A (30%PRP/DPB complex, n=18), group B (60%PRP/DPB complex, n=18) and group C (100%PRP/DPB complex, n=18). The legs of the rabbits were randomly divided into experimental side and the control side; ACL was reconstructed by semitendinosus and RPP/DPB complex in bone tunnel in the experimental side, and only by semitendinosus in the control side. The general conditions of the rabbits were observed postoperatively and HE staining was used to observe the tendon-bone healing, then I-IV levels of semi-quantitative analysis of the tendon-bone healing were evaluated according to Buark Demirag standard at 3, 6 and 12 weeks.

Results General observation: Synovial fluid slightly increased in the specimens and no bony tissue was found in inner of femoral tunnel at 3 weeks; there was no synovial fluid in all the specimens and scar tissue was discovered in inner of femoral tunnel at 6 weeks; and there was no synovial fluid and the tendons became tighter with fibrous tissue at 12 weeks. Histology observation: New granulation tissue formed in the tendon-bone interface of group A experimental sides at 3 weeks; there was various widths Sharpey type textile fiber in the tendon-bone interface at 6 weeks; Sharpey type textile fiber arranged regularly, which formed an irregular and blur "tidal

line" at 12 weeks. Group B experimental sides were better than any other group at 3, 6 and 12 weeks; chondrocytes-like arranged regularly in the tendon-bone interface at 3 weeks; the number of chondrocytes-like per unit area was more than that of the other groups at 6 weeks; and chondrocytes-like proliferated and matured in the tendon-bone interface, Sharpey type textile fiber became tighter and ordered. Group C experimental sides was similar to both sides of group A at 3 weeks, however, the proliferation of relatively mature dense connective tissue was worse than that of other groups at 6 and 12 weeks. According to Buark Demirag grading, there were statistically significant differences in tendon-bone healing between the experimental sides and the control sides of group B at 3 and 6 weeks, and between groups B experimental sides and C experimental sides at 12 weeks ($P < 0.05$).

Conclusion The mixture of PRP/PRP has good biocompatibility and bone induction, so it can enhance tendon-bone healing after ACL reconstruction when the concentration of PRP was 60%.

Key Words: Platelet-rich Plasma; Anterior Cruciate Ligament; Tendon -bone Union.

Foundation item: Military Innovation Foundation (09MA070)

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
绪论	1
正文	3
实验材料	4
实验方法	5
结果	11
讨论	16
结论	20
参考文献	21
附 图	28
综 述	31
公开发表的论文	54
致 谢	55

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Introduction	1
T e x t	3
Materials	4
Methods	5
Results	11
Discussion	16
Conclusion	20
References	21
Drawing	28
Overview	31
Publication	54
Acknowledgements	55

绪 论

一、前交叉韧带（ACL）重建研究现状及成果

随着人民生活质量的提高,参与体育运动越来越多,另外高速交通工具的普及使得前交叉韧带（ACL）损伤的机会也越来越大。交叉韧带是膝关节重要的静力性稳定结构,一旦损伤难以自愈,常造成严重的膝关节不稳,继而发生半月板损伤和骨关节炎。为了恢复膝关节的正常结构和功能,常常需要手术重建前交叉韧带。ACL 重建主要有以下几种手段:一是骨-髌韧带-骨重建 ACL,其骨隧道部分的愈合为直接的骨愈合,曾经是 ACL 重建的金标准^[1-3],但并发症比较多,如手术切口大、术后膝前疼痛发生率高、活动度丢失、股四头肌肌力减弱、髌股关节疼痛、膝前疼痛等^[4]。二是人工韧带重建,如 L-K 韧带、LARS 韧带等均已应用于临床。人工韧带由于缺乏腱-骨愈合的能力,在长期应力作用下,将导致劳损性松动、断裂,导致重建失败^[5]。现阶段昂贵的价格也限制了人工韧带在临床的广泛使用。三是同种异体或自体肌腱移植重建,这也是目前较为关注的热点,其重建后腱-骨愈合的研究近期一直吸引着骨科学及运动医学领域的极大兴趣。Rudolf W Poolman 等^[6]的研究表明利用自体腘绳肌重建 ACL 随着技术的日益成熟,和骨-髌韧带-骨 (bone- patellar tendon- bone, BTB) 重建 ACL 两者在膝关节的稳定性方面没有显著的统计学差异,且可显著降低膝前痛发生率,认为 ACL 的重建自体腘绳肌优于骨-髌韧带-骨重建。鉴于骨-髌韧带-骨重建 ACL 存在术后供区并发症的问题,现在临床多使用半腱肌和股薄肌肌腱作为自体移植物^[7-10]。应用肌腱重建 ACL,由于肌腱两端不带骨,肌腱穿过骨隧道固定后其两端为腱-骨愈合,较应用骨-髌韧带-骨重建的骨-骨愈合复杂得多^[11-13]。

二、ACL 重建两种愈合方式:直接愈合及间接愈合

重建 ACL 的目的在于恢复其解剖形态和生理功能,重建后 ACL 的止点对于恢复韧带的生理功能非常重要。韧带止点分为间接止点和直接止点。正常 ACL 止点是典型的直接止点,具有典型的末端结构,以韧带与骨软骨的结合为特征,包括四个区,即致密结缔组织、纤维软骨、钙化纤维软骨和骨组织,间接止点即为在移植肌腱与骨隧道之间的连接组织为胶原纤维(Sharpey 纤维)。直接止点主要通过强度逐级递减的特有结构缓冲应力,间接止点则主要通过较大的止点面积缓冲应力。就单位面积缓冲应力的力学性能来说,直接止点显然较间接止点更坚

固。ACL 重建腱-骨愈合相应存在直接愈合和间接愈合两种类型。

Tomita 等^[14]分别用双股屈肌腱(FT)和骨-髌腱-骨(BPTB)移植重建 ACL, 固定方式均为悬吊固定, 结果分析表明悬吊固定在腱-骨界面间可见 Sharpey 纤维, 更倾向于形成间接愈合。Weiler 等^[15]利用羊自体跟腱移植重建 ACL, 固定方式为可吸收螺钉界面挤压固定, 经不同时期的观测发现腱-骨界面的愈合与正常 ACL 的附着区域极为相似, 表现为直接愈合。结果提示, 挤压固定可以在腱、骨之间形成直接愈合。

三、促进 ACL 重建腱-骨愈合的方法

同种自体或异体肌腱移植重建术后成功的关键在于保持移植肌腱的张力及肌腱移植植物与骨隧道的牢固愈合, 但重建后腱-骨愈合缓慢, 这就导致术后短期内腱-骨界面是个薄弱点^[16]。腱-骨愈合缓慢将影响早期的康复, 以及出现中后期骨隧道扩大, 并对最终的效果有潜在影响。基于此, 许多研究者采用不同的策略以增强腱-骨界面的修复。实验研究表明骨膜、软骨、细胞生长因子、透明质酸、间充质干细胞、磷酸钙、骨形态发生蛋白等均能不同程度的促进肌腱移植植物在骨隧道内腱-骨愈合^[17-23]。各种物理的方法如机械电刺激(FES)、冲击波(SW)、低强度脉冲超声(LIPUS)、高压氧(HBO)等也已应用到腱-骨愈合中^[24-27]。

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是自体全血经过浓集、分离而获得的血液制品。其特点是 PRP 中的血小板浓度比全血高 4~5 倍以上, PRP 中的血小板经激活后能释放出大量高浓度的生长因子^[28-29], 这些生长因子已被证实单独应用或联合应用时能刺激细胞增殖分化^[30], 促进软组织的修复^[31-32], 在各种动物以及临床试验中也显示了良好的促进骨缺损与肌腱等组织修复的特性^[33-36], 尽管所有参与组织修复与重建的细胞因子作用机制仍不明确^[37], 但是部分作用已经了解, 如: PDGF 促进骨细胞增殖^[38], TGF- β 具有刺激骨原细胞增殖, 同时抑制晚期细胞分裂及矿化^[39], IGF-I 可以提高晚期分化及增加成骨细胞活力, VEGF 可诱导内皮细胞增殖迁移从而促进新生血管形成等^[40]。此外 PRP 中的生长因子除了直接促进局部细胞的增殖与分化外, 随着时间的推移, 还将巨噬细胞趋化到组织修复部位^[41]。巨噬细胞连续累积是腱-骨愈合早期细胞来源^[42], 同时巨噬细胞分泌多种生长因子如巨噬细胞源性生长因子、TGF- β 等, 成为生长因子的新来源, 从而长期促进组织修复。PRP 应用已成为骨缺损及韧带等组织损伤修复研究领域近年来的热点课题, 人们将 PRP 应用于骨组织工程的研究中, 但研究结

果不尽相同^[43-53]——分析相关文献得知：PRP 促进了骨和软组织的再生和修复及 PRP 对骨前体细胞的增殖作用存在量效关系^[54-60]。

四、研究目的、方法

因此我们假设以小牛脱蛋白骨（DPB）作为支架材料复合 PRP 后用氯化钙和凝血酶激活，形成凝胶，填充于骨隧道的腱-骨界面，PRP 中的各种自身生长因子在骨隧道局部的释放对于促进 ACL 重建中腱-骨愈合是有帮助的，且 PRP 有一个最佳的浓度范围。为了验证我们的假设，我们在新西兰大白兔建立 ACL 重建模型，利用组织学检验 PRP 和 DPB 复合后的功效，并确定两者复合后 PRP 的最佳浓度，不但具有重要的理论意义，而且具有重要的临床意义和巨大的社会价值。

实验材料

一、实验动物

选取健康成年新西兰大白兔 58 只（清洁级，厦门大学动物中心提供），兔龄 6~12 个月,平均体重 2.5 ± 0.4 kg (SD)，骨骼成熟，雌雄不限。单独喂养并检疫 7 天备用，术前实验动物运动正常，未发现膝关节周围肿胀，双膝关节均进行前抽屉实验、Lachman 试验检查阴性，证实其前交叉韧带正常。（附图 1）

二、主要试剂

麻醉剂 陆眠宁 II（2ml/支，吉林省华牧动物保健品有限公司）

盐酸氯胺酮注射液（2ml/支，江苏恒瑞医药股份有限公司）

牛凝血酶（1000U/支，冻干粉剂，美国 Sigma 公司）

氯化钙凝结剂（美国 Sigma 公司）

枸橼酸钠抗凝剂（中国医药集团试剂公司）

三、主要仪器及工具

手术器械由厦门大学附属东南医院中心实验室提供

LH50A 超净工作台（苏净集团安泰技术公司）

切片机 LEICA RMZi55（德国）

电子显微镜 OLYMPUS（日本）

低温离心机（德国 H）

环氧乙烷消毒锅（台湾 HL821）

血液分析仪（美国 Cell-Dny3500）

血小板振荡培养箱（美国 Fomraseientifie3612）

架盘药物天平（上海医疗器械八厂 HC-TP 12B-10）

一次性玻璃采血管（福州长庚医疗器械有限公司&无添加剂）

真空抗凝管（福州长庚医疗器械有限公司）

10ml 注射器（福州长庚医疗器械有限公司）

移液管（福州长庚医疗器械有限公司）

移液枪（福州长庚医疗器械有限公司）

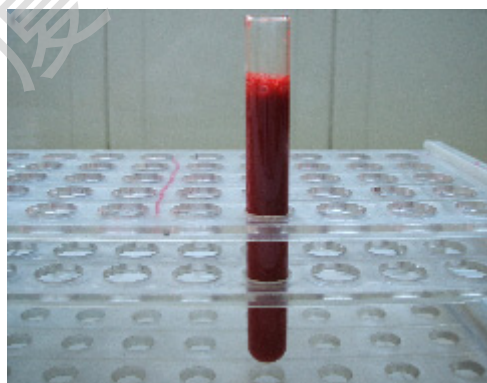
实验方法

一、PRP 的制备

在严格无菌的条件下，采用含 0.8 mL10% 枸橼酸钠的注射器，于每只兔耳中央动脉抽取 8 mL 动脉血。取其中 1 mL 行血小板计数；其余 7 mL 采用 Landesberg 法^[61]制备 PRP：将动脉血以 $200\times g$ 离心 10min，取上清液至交界面下 3 mm，同上法再次离心后，先吸取约 1/4 上清液作为稀释剂备用，再吸弃余下离心后血液的 2/4，剩余即为 PRP。分别取 1 滴 PRP 及稀释用上清液进行血小板计数。将 PRP 与稀释用上清液按体积比制备不同浓度（30%、60%、100%）PRP，并对不同浓度 PRP 进行血小板计数。

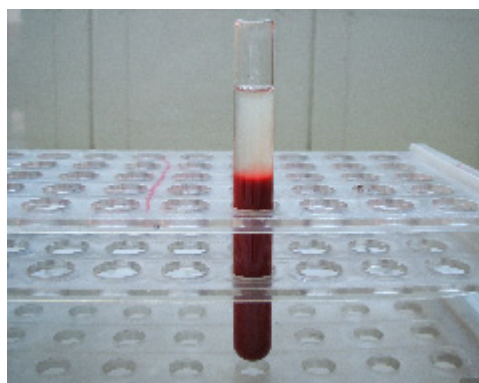


具体操作步骤如下：



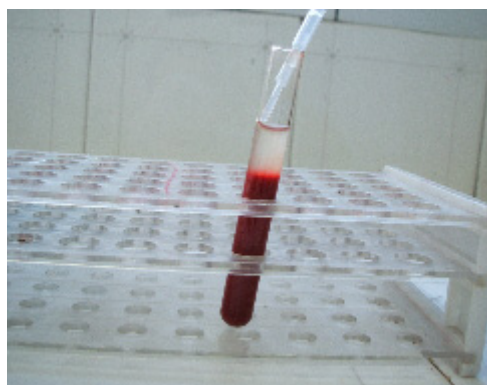
1、采集抗凝血

1、Collecting anticoagulant



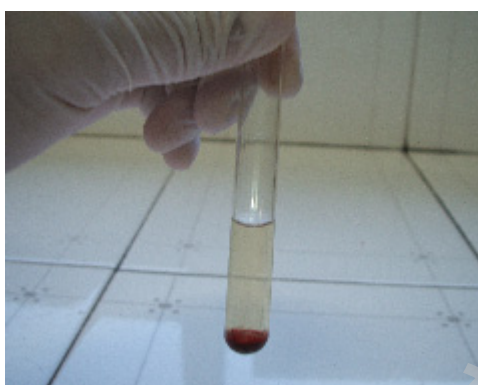
2、第一次离心

2、The first time centrifugation



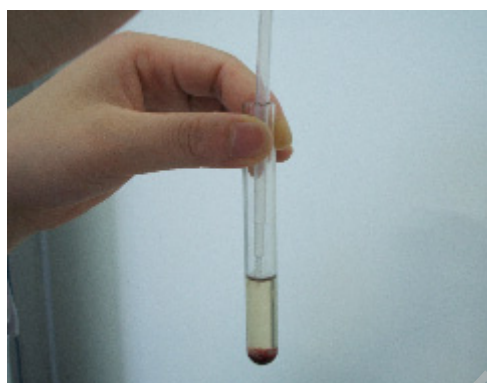
3、去掉红细胞层

3、Removing red blood cell layer



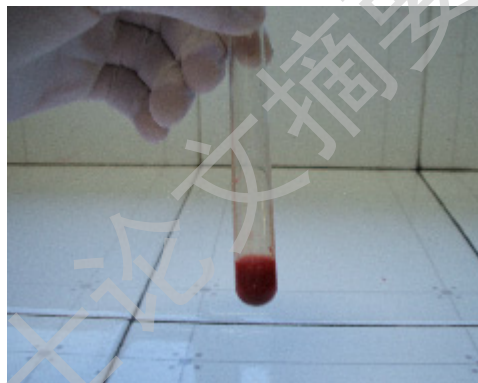
4、第二次离心

4、The second time centrifugation



5、去掉 3/4 上清液

5、Removing 3/4 liquid supernatant



6、摇匀获得富血小板血浆

6、Shaking up to get PRP

二、DPB 的制备

根据丁真奇等^[62]介绍的方法,取新鲜新生小牛股骨骺端松质骨,制成火柴棒状,然后用温水冲洗数次,初步去除骨表面及孔隙中的油脂,接着用 30%双氧水、乙醚交替浸泡 24 小时,连续 6 次,制成脱蛋白牛松质骨,洗净、烘干、分袋、再经环氧乙烷消毒,备用。(图 1)。

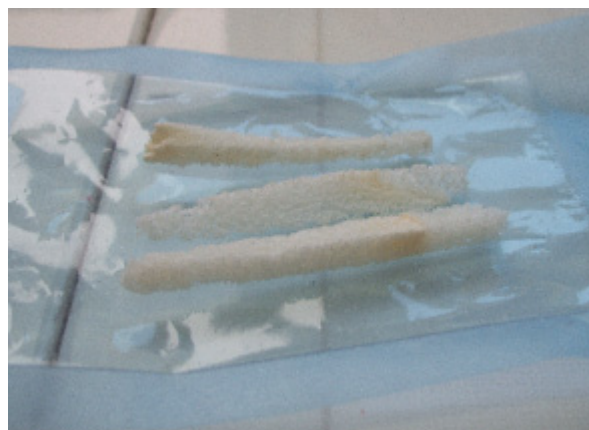


图 1. 脱蛋白骨

Figure.1 DPB

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库